

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 430号	学位授与年月日	平成18年 6月16日
氏 名	師 恩 祐		
論文題目	NS-7, a novel Na ⁺ /Ca ²⁺ channel blocker, prevents neurologic injury after spinal cord ischemia in rabbits (ウサギの脊髄虚血における新規 Na ⁺ /Ca ²⁺ チャンネル阻害薬 NS-7 の神経障害防止効果の検討)		

博士(医学) 師 恩 祐

論文題目

NS-7, a novel $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ channel blocker, prevents neurologic injury after spinal cord ischemia in rabbits

(ウサギの脊髄虚血における新規 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ チャンネル阻害薬NS-7の神経障害防止効果の検討)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

下行大動脈瘤および胸腹部大動脈瘤に対する手術において、脊髄虚血による対麻痺を如何に防ぐかは心臓血管外科における重要な課題の一つである。電位依存性 Na^+ チャンネルおよび Ca^{2+} チャンネルが神経虚血障害に関与していることが判明しており、電位依存性 Na^+ が開放し虚血グルタミン酸塩放出と細胞内 Ca^{2+} 流入を促進することが、脳虚血後神経細胞変性の主な原因と考えられている。従って、 Na^+ および Ca^{2+} チャンネル阻害薬が脊髄と脳虚血に対し神経保護作用があることが示唆されている。

NS-7 (4-[4-fluorophenyl]-2-methyl-6-[5-piperidinopentyloxy] pyrimidine hydrochloride) は、電位依存性 Na^+ と Ca^{2+} チャンネル阻害薬として新たに開発された神経保護薬である。そこで我々は、ウサギ脊髄虚血モデルを作成し、大動脈遮断前後にNS-7を投与し、下肢運動機能への影響と神経細胞壊死およびアポトーシスの防止効果について検討した。

〔材料ならびに方法〕

ニュージーランド白色家兎(2.2~3.0kg) 26羽を無作為に4群に分け、ペントバルビタール(25 mg/kg)麻酔下に開腹し、偽手術群(3羽)を除き、他の3群は腎下大動脈を20分遮断し、脊髄虚血モデルを作成した。術中深部体温は 38.5°C に維持した。対照群(7羽)は、遮断前に生理食塩水の投与を行った。A群(8羽)は遮断15分前にNS-7(1mg/kg)を投与し、B群(8羽)では再灌流後にNS-7(1mg/kg)を投与した。手術後24時間と48時間にTarlov scoreを用いて神経機能を評価した。その後、脊髄を摘出し、病理組織学的検査(HE染色、TUNEL染色およびTTC染色)を行った。

〔結果〕

術後24時間と48時間でのTarlov score評価で、A群とB群において対照群に比し運動機能が改善されていた。対照群では著明な脊髄神経組織壊死を認めたのに対し、NS-7投与群の脊髄では組織学的な変化は軽度であった。TTC染色による梗塞面積の評価では、対照群の平均梗塞面積 $54.7 \pm 19.8\%$ に対し、A群では梗塞面積 $14.0 \pm 14.3\%$ ($p < 0.05$)、B群では梗塞面積 $12.1 \pm 12.8\%$ ($p < 0.05$)であり、有意に減少していた。A群、B群ともにTUNEL陽性神経細胞が有意に減少していた($p < 0.05$)。脊髄保護作用において、A群とB群間に有意な差は見られなかった。また本研究においてNS-7による低血圧は観察されなかった。

〔考察〕

虚血により過度のグルタミン酸が放出されると、細胞内 Ca^{2+} 濃度が増え、電位依存性 Na^+ と Ca^{2+} チャンネルの活性化がおこる。それにより、細胞内 Na^+ 濃度の上昇がおこり、神経細胞膜が脱分極し、電位依存性 Na^+ と Ca^{2+} チャンネルが更に活性化される。細胞内 Na^+ が更に増加し、大量のグルタミン酸が発生し、結果的に細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスが崩壊され、各種細胞内で Ca^{2+} -依存性酵素が活性化され、神経細胞死に

至る。新しい神経保護剤であるNS-7は電位依存性 Na^+ と Ca^{2+} チャンネルをブロックすることで、電位依存性 Na^+ と Ca^{2+} チャンネル活性化による神経細胞死をくい止める役割がある。

中大脳動脈閉塞後にNS-7投与により脳梗塞面積を縮小するとの報告がある。また虚血 6 時間と 12 時間後のNS-7投与において梗塞面積を減少させたとの報告もある。しかしながら、NS-7の脊髄に対する保護効果を調査した報告はない。

本研究において、NS-7による脊髄神経保護作用が明確に観察された。TTC 染色でNS-7投与による脊髄梗塞面積の減少を認め、また抗壊死作用に加えて、TUNEL染色によりアポトーシスの防止効果についても認めた。

過去に様々な $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ チャンネル阻害薬が神経保護作用を有すると報告されたが、低血圧や不整脈等の心血管系に及ぼす副作用のために、臨床使用には至っていない。本研究において、NS-7投与による低血圧等の副作用は観察されなかったが、NS-7は心臓より脳に多く分布しやすく、心血管系への副作用は少ないと考えられている。

〔結論〕

脊髄虚血に対して、NS-7が神経細胞壊死およびアポトーシスを軽減する可能性が示唆された。心機能に対する副作用も少ないと思われ、下行大動脈瘤および胸腹部大動脈瘤手術における脊髄保護薬として用いることで、優れた臨床成績が期待される。

論文審査の結果の要旨

下行大動脈瘤や胸腹部大動脈瘤の手術では、脊髄虚血による対麻痺は重篤な合併症である。電位依存性 Na^+ チャンネルおよび Ca^{2+} チャンネルが神経虚血障害に関与していることが判明しており、電位依存性 Na^+ が開放し虚血グルタミン酸塩放出と細胞内 Ca^{2+} 流入を促進することが、脳虚血後神経細胞変性の主な原因と考えられている。また Na^+ および Ca^{2+} チャンネル阻害薬が脊髄と脳虚血に対し神経保護作用があることが示唆されている。

そこで申請者は上記作用を有する新たに開発された神経保護薬NS-7 (4-[4-fluorophenyl]-2-methyl-6-[5-piperidinopentyloxy] pyrimidine hydrochloride) を用いて、ウサギ脊髄虚血モデルにおける下肢運動機能への影響と脊髄神経細胞の壊死およびアポトーシスの抑制効果について検討した。

方法として、ニュージーランド白色家兎26羽を無作為に4群に分け、ペントバルビタール麻酔下に開腹し、腎下大動脈を20分遮断し、脊髄虚血モデルを作成した。対照群(7羽)は生理食塩水、A群(8羽)は遮断15分前にNS-7(1mg/kg)、B群(8羽)では再灌流後にNS-7(1mg/kg)を投与した。手術後24時間と48時間に神経機能を評価した。その後、脊髄を摘出し、病理組織学的検査(HE染色、TUNEL染色およびTTC染色)を行った。

結果は、術後24、48時間の神経機能評価で、A群とB群では対照群より運動機能が改善されていた。対照群では著明な脊髄神経組織壊死を認めたが、NS-7投与群の変化は軽度であった。TTC染色による梗塞面積の評価は、対照群 $54.7 \pm 19.8\%$ に対し、A群 $14.0 \pm 14.3\%$ ($p < 0.05$)、B群 $12.1 \pm 12.8\%$ ($p < 0.05$) と減少した。A群、B群ともTUNEL陽性神経細胞が有意に減少した($p < 0.05$)。A群とB群間の脊髄保護作用では有意な差は見られなかった。

これらの結果から、虚血により過度のグルタミン酸が放出されると、細胞内 Ca^{2+} 濃度が増え、電位依存

性 Na^+ と Ca^{2+} チャンネルの活性化がおこる。それにより、細胞内 Na^+ 濃度が上昇し、細胞膜が脱分極して電位依存性 Na^+ と Ca^{2+} チャンネルが更に活性化される。細胞内 Na^+ が更に増加し、大量のグルタミン酸が発生し、結果的に細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスが崩壊され、各種細胞内で Ca^{2+} -依存性酵素が活性化され、神経細胞死に至る。NS-7は電位依存性 Na^+ と Ca^{2+} チャンネルをブロックすることで、電位依存性 Na^+ と Ca^{2+} チャンネル活性化による神経細胞死をくい止める役割がある。

中大脳動脈閉塞後のNS-7が脳梗塞面積を縮小するとの報告や、虚血6時間と12時間後のNS-7投与で梗塞面積を減少させたとの報告はあるが、脊髄虚血における研究は認められない。本研究ではNS-7が脊髄神経保護作用を有することも観察された。

過去に様々な $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ チャンネル阻害薬が神経保護作用を有すると報告されたが、低血圧や不整脈等の副作用のために、臨床使用には至っていない。本研究ではNS-7投与による副作用は観察されなかった。理由としてNS-7は心臓より脳に多く分布しやすく、心血管系への副作用は少ないと考えられているからであると考察した。

以上から申請者は、脊髄虚血に対して、NS-7が神経細胞壊死およびアポトーシスを軽減する可能性があることを示唆し、下行大動脈瘤および胸腹部大動脈瘤手術における脊髄保護薬として用いることで、優れた臨床成績が期待されると結論した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) NS-7の投与量を1mg/kgとした根拠は、用量依存性は調べられているのか
- 2) 前投与と後投与群で結果に差が見られなかったのはなぜか
- 3) グルタミン酸は虚血中、虚血後、どちらで多く産生されるか
- 4) NS-7の薬理作用のメカニズムについて
- 5) NS-7の薬物動態について、持続投与の必要はないのか
- 6) 結果の評価は誰が行なったのか
- 7) 今回使用した虚血モデルの特徴について
- 8) 虚血時間の設定の根拠について
- 9) 梗塞面積と神経徴候との相関について
- 10) 血管の結紮自体が再灌流後の脊髄血流に影響を与えないか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	佐藤重仁	
	副査	梅村和夫	副査 難波宏樹